

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090573 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/00,
G01N 33/543, C12Q 1/68

[DE/DE]; Karl-Marx-Ring 58, 81735 München (DE).
HOFMANN, Franz [DE/DE]; Herbergstrasse 25B, 80995
München (DE). LUYKEN, Richard, Johannes [DE/DE];
Boecklerweg 28, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01700

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Mai 2002 (10.05.2002)

(74) Anwalt: VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;
Postfach 22 14 43, 80504 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
101 22 659.4 10. Mai 2001 (10.05.2001) DE

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): INFINEON TECHNOLOGIES AG [DE/DE]; St.-
Martin-Strasse 53, 81669 München (DE).

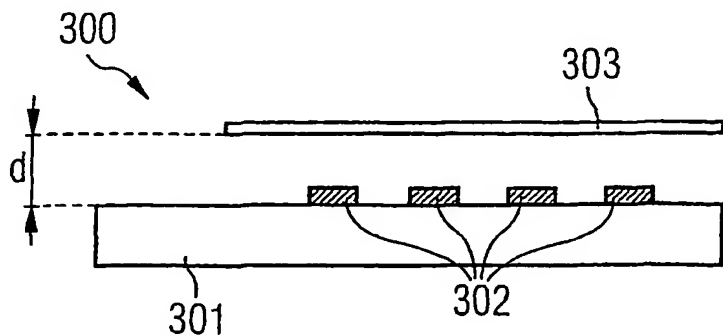
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FREY, Alexander

(54) Title: BIOCHIP ARRANGEMENT

(54) Bezeichnung: BIOCHIP-ANORDNUNG



(57) Abstract: The biochip comprises a substrate, at least one sensor, arranged on or in the substrate and an electrically conducting permeation layer, arranged at a given, non-zero separation from the surface of the substrate, to which an electrical voltage may be applied. The biochip arrangement may be used, for example, as a DNA sensor, whereby a receptor molecule, immobilised on the sensor electrode, hybridises a DNA molecule and thus an electrical sensor signal which may be drawn from between sensor electrodes, is influenced in a characteristic manner.

(57) Zusammenfassung: Die Biochip-Anordnung weist auf ein Substrat, mindestens einen auf oder in dem Substrat angeordneten Sensor und eine elektrisch leitfähige Permeationsschicht, die in einem vorgegebenen, von Null verschiedenen Abstand von der Oberfläche des Substrats angeordnet ist, und an die eine elektrische Spannung anlegbar ist. Die Biochip-Anordnung ist beispielsweise als DNA-Sensor verwendbar, indem an Sensor-Elektroden immobilisierte Fängermoleküle DNA-Moleküle hybridisieren und so ein zwischen Sensor-Elektroden, abnehmbares elektrisches Sensorsignal charakteristisch beeinflusst wird.

WO 02/090573 A2

Beschreibung**Biochip-Anordnung**

5 Die Erfindung betrifft eine Biochip-Anordnung.

Die Bio- und Gentechnologie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Eine Grundtechnik in der Bio- und Gentechnologie ist es, biologische Moleküle wie DNA
10 (Desoxyribonukleinsäure) oder RNA, Proteine, Polypeptide, etc. nachweisen zu können. Insbesondere Bio-Moleküle, in denen Erbgutinformation kodiert ist, insbesondere DNA-Moleküle (Desoxyribonukleinsäure) sind für viele medizinische Anwendungen von großem Interesse.

15

Eine DNA ist eine Doppelhelix, die aus zwei vernetzten wendelförmigen Einzelketten, sogenannten Halbsträngen, aufgebaut ist. Jeder dieser Halbstränge weist eine Basensequenz auf, wobei durch die Reihenfolge der Basen
20 (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin) die Erbinformation festgelegt ist. DNA-Halbstränge weisen die charakteristische Eigenschaft auf, sehr spezifisch nur mit ganz bestimmten anderen Molekülen eine Bindung einzugehen. Daher ist es für das Andocken eines Nukleinsäurestrangs an einen anderen
25 Nukleinsäurestrang Voraussetzung, dass die beiden Moleküle zueinander komplementär sind. Anschaulich müssen die beiden Moleküle zueinander passen wie ein Schlüssel und das dazu passende Schloss (sogenanntes Schlüssel-Schloss-Prinzip).

30 Dieses von der Natur vorgegebene Prinzip kann zum selektiven Nachweis von Molekülen in einer zu untersuchenden Flüssigkeit verwendet werden. Die Grundidee eines auf diesem Prinzip basierenden Biochip-Sensors besteht darin, dass auf einem Substrat aus einem geeignetem Material zunächst sogenannte
35 Fängermoleküle (z.B. mittels Mikrodispensierung) aufgebracht und immobilisiert werden, d.h. an der Oberfläche des Biochip-Sensors dauerhaft fixiert werden. In diesem Zusammenhang ist

es bekannt, Bio-Moleküle mit Thiol-Gruppen (SH-Gruppen) an Gold-Oberflächen zu immobilisieren.

Ein solcher Biochip-Sensor mit einem Substrat mit daran gebundenen Fängermolekülen, die beispielsweise auf einen bestimmten, nachzuweisenden DNA-Halbstrang sensitiv sind, wird üblicherweise zum Untersuchen einer Flüssigkeit auf das Vorhandensein des auf die Fängermoleküle sensitiven DNA-Halbstrangs verwendet werden. Hierzu ist die auf das Vorhandensein eines bestimmten DNA-Halbstrangs zu untersuchende Flüssigkeit mit den immobilisierten Fängermolekülen in Wirkkontakt zu bringen. Sind ein Fängermolekül und ein zu untersuchender DNA-Halbstrang zueinander komplementär, so hybridisiert der DNA-Halbstrang an dem Fängermolekül, d.h. er wird daran gebunden. Wenn infolge dieser Bindung sich der Wert einer messtechnisch erfassbaren physikalischen Größe in charakteristischer Weise ändert, so kann der Wert dieser Größe gemessen werden und auf diese Weise das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines DNA-Halbstrangs in einer zu untersuchenden Flüssigkeit nachgewiesen werden.

Das beschriebene Prinzip ist nicht auf den Nachweis von DNA-Halbsträngen beschränkt. Vielmehr sind weitere Kombinationen von auf dem Substrat aufgebrachten Fängermolekülen und zu erfassenden Molekülen in einer zu untersuchenden Flüssigkeit bekannt. So können beispielsweise Nukleinsäuren als Fängermoleküle für Peptide oder Proteine, die nukleinsäurespezifisch binden, verwendet werden. Weiterhin bekannt ist, Peptide oder Proteine als Fängermoleküle für andere, das Fängerpeptid bzw. das Fängerprotein bindende Proteine oder Peptide zu verwenden. Von Bedeutung ist ferner die Verwendung von niedermolekularen chemischen Verbindungen als Fängermoleküle für an diese niedermolekularen Verbindungen bindende Proteine oder Peptide. Niedermolekulare chemische Verbindungen sind solche chemischen Verbindungen, die weniger als etwa 1700 Dalton (Molekulargewicht in Gramm

pro Mol) aufweisen. Umgekehrt ist auch die Verwendung von Proteinen und Peptiden als Fängermoleküle für eventuell in einer zu untersuchenden Flüssigkeit vorhandene niedermolekulare Verbindungen möglich.

5

Zum Nachweis der erfolgten Bindung zwischen dem auf dem Substrat aufgebrachten Fängermolekül und dem in der zu untersuchenden Flüssigkeit vorhandenen, zu erfassenden Molekül werden häufig elektronische Nachweisverfahren verwendet. Solche Nachweisverfahren erlangen zunehmende Bedeutung bei der industriellen Identifikation und Bewertung von neuen Medikamenten organischer oder gentechnologischer Herkunft. Diese Nachweisverfahren eröffnen vielfältige Anwendungen beispielsweise in der medizinischen Diagnostik, in der Pharmaindustrie, in der chemischen Industrie, in der Lebensmittelanalytik, sowie in der Umwelt- und Lebensmitteltechnik.

10

15

20

25

30

35

In Fig. 1A und Fig. 1B ist eine Biochip-Anordnung gemäß dem Stand der Technik gezeigt, die als DNA-Sensor gemäß dem oben beschriebenen Prinzip verwendet werden kann. Die Biochip-Anordnung 100 weist ein Substrat 101 auf, in dessen Oberflächenbereich eine erste Elektrode 102 sowie eine zweite Elektrode 103 angeordnet sind. Die erste Elektrode 102 ist mit einem ersten elektrischen Kontakt 104 gekoppelt. Die zweite Elektrode 103 ist mit einem zweiten elektrischen Kontakt 105 gekoppelt, wobei zwischen dem ersten elektrischen Kontakt 104 und dem zweiten elektrischen Kontakt 105 ein elektrisches Signal abnehmbar ist. An der Oberfläche der ersten Elektrode 102 und an der Oberfläche der zweiten Elektrode 103 sind eine Vielzahl von Fängermolekülen 106 immobilisiert. Häufig sind die erste Elektrode 102 und die zweite Elektrode 103 aus einem Gold-Material hergestellt, und die Immobilisierung der Fängermoleküle 106 auf der ersten und der zweiten Elektrode 102, 103 ist oft als Gold-Schwefel-Koppelung realisiert. Viele Bio-Moleküle weisen Schwefelatome in ihren Endabschnitten auf, beispielsweise sogenannte Thiol-

Gruppen (SH-Gruppen): Das Materialpaar Gold-Schwefel weist besonders günstige Kopplungseigenschaften auf. Ferner ist in **Fig. 1A** eine zu untersuchende elektrolytische Flüssigkeit 107 gezeigt, die möglicherweise zu den Fängermolekülen 106 komplementäre DNA-Halbstränge 108 aufweist.

Sofern die Fängermoleküle 106 gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip (gemäß welchem nur diejenigen Moleküle in der zu untersuchenden Flüssigkeit 107 von den Fängermolekülen 106 gebunden werden können, für welche die letzteren eine ausreichende Bindungsspezifität besitzen) mit einem in der zu untersuchenden Flüssigkeit 107 vorhandenen Molekül eine spezifische Bindungsreaktion eingehen, wird das Molekül (z.B. ein DNA-Halbstrang 108) in der zu untersuchenden Flüssigkeit 107 durch die Fängermoleküle 106 spezifisch gebunden. Ist dies nicht der Fall, so wird das Molekül in der zu untersuchenden Flüssigkeit 107 nicht von einem der Fängermoleküle 106 gebunden. Sind in der zu untersuchenden elektrolytischen Flüssigkeit 107 DNA-Stränge 108 mit einer Basensequenz enthalten, die zu der Basensequenz der Fängermoleküle 106 (d.h. der DNA-Sondenmoleküle) komplementär ist, so hybridisieren diese DNA-Halbstränge 108 mit den DNA-Sondenmolekülen 106. Dies ist in **Fig. 1B** gezeigt.

Eine Hybridisierung eines DNA-Sondenmoleküls 106 mit einem DNA-Halbstrang 108 findet nur dann statt, wenn die Basensequenzen des jeweiligen DNA-Sondenmoleküls 106 und des passenden DNA-Halbstrangs 108 zueinander komplementär sind. Ist dies nicht der Fall, so findet keine Hybridisierung statt. Somit ist ein DNA-Sondenmolekül 106 einer vorgegebenen Basensequenz jeweils nur in der Lage, ganz bestimmte, nämlich DNA-Halbstränge mit komplementärer Basensequenz zu binden, d.h. mit diesem zu hybridisieren. Unter Hybridisieren wird das Anbinden von DNA-Halbsträngen an Fängermoleküle bezeichnet.

Eine erfolgte Hybridisierung von DNA-Halbsträngen 108 an Fängermoleküle 106 beeinflusst ein zwischen dem ersten elektrischen Kontakt 104 und dem zweiten elektrischen Kontakt 105 abnehmbares elektrisches Signal in charakteristischer Weise. Die DNA-Halbstränge 108 und die Fängermoleküle 106 sind weitestgehend elektrisch nichtleitend und schirmen anschaulich die erste Elektrode 102 bzw. die zweite Elektrode 103 elektrisch ab. Dadurch ändert sich die Kapazität zwischen der ersten Elektrode 102 und der zweiten Elektrode 103. Die Änderung der Kapazität wird als Messgröße für die Erfassung von DNA-Molekülen verwendet. Sind nämlich nachzuweisende Moleküle in der zu untersuchenden Flüssigkeit enthalten, und haben diese mit den Fängermolekülen auf der Oberfläche der Elektroden hybridisiert, so ändert sich der messtechnisch erfassbare Wert der Kapazität der als Kondensatorflächen interpretierbaren Elektroden 102, 103.

In **Fig. 2A** ist eine Draufsicht einer Biochip-Anordnung 200 mit Interdigitalelektroden 202, 203 gezeigt. Ferner ist in **Fig. 2B** ein Querschnitt der in **Fig. 2A** gezeigten Biochip-Anordnung 200 entlang der Linie I-I' gezeigt. Die Biochip-Anordnung 200 weist ein Substrat 201, eine erste Interdigitalelektrode 202 und eine zweite Interdigitalelektrode 203 auf. Durch die in **Fig. 2A**, **Fig. 2B** gezeigten ersten und zweiten Interdigitalelektroden 202, 203 ist auf dem Substrat eine annähernd mäanderförmige Oberflächenstruktur ausgebildet.

Jedoch weisen die beschriebenen Biochip-Anordnungen gemäß dem Stand der Technik eine Reihe von Nachteilen auf. Häufig liegen biologische Moleküle wie beispielsweise DNA-Halbstränge oder Proteine in sehr geringer Konzentration vor (millimolar, manchmal sogar nur mikromolar). Daher ist die Ansprechzeit der in **Fig. 1A**, **Fig. 1B**, **Fig. 2A**, **Fig. 2B** gezeigten DNA-Sensoren sehr hoch.

Unter Ansprechzeit wird eine charakteristische Zeit verstanden, die abgewartet werden muss, bis nachzuweisende Moleküle an Fängermolekülen in ausreichender Anzahl gebunden haben, und als Folge davon eine messtechnisch nachweisbare
5 Änderung der Kapazität erfolgt ist.

Indem die Hybridisierung, die Voraussetzung für die Funktionsweise des Biosensors ist, erst nach einer erheblichen Ansprechzeit eintritt, ist die Biochip-Anordnung
10 gemäß dem Stand der Technik, nur sehr begrenzt unter praktischen Laborbedingungen einsetzbar. Regelmäßig wird ein schneller Nachweis von Molekülen angestrebt. Vielfach denaturieren nachzuweisende Bio-Moleküle, beispielsweise instabile Mutanten von Proteinen, bereits mit Zeitkonstanten
15 von einigen Stunden und weniger. Daher ist die langsame Ansprechzeit des beschriebenen, aus dem Stand der Technik bekannten DNA-Sensors, äußerst nachteilhaft und schränkt die Anwendbarkeit der Vorrichtung ein.

20 Ferner ist die Sensitivität der Biochip-Anordnung gemäß dem Stand der Technik nicht ausreichend hoch, was ebenfalls mit der geringen Konzentration der nachzuweisenden Bio-Moleküle in der Umgebung der mit Fängermolekülen versehenen Elektroden zusammenhängt.

25 Aus [1] ist eine Biochip-Anordnung bekannt, die es ermöglicht, auch bei geringen DNA-Konzentrationen eine ausreichend große Anzahl von DNA-Molekülen in ausreichend kurzer Zeit an den Fängermolekülen andocken zu lassen. Dies
30 wird gemäß [1] erreicht, indem eine sogenannte Permeationsebene direkt auf den Chip aufgebracht wird. Die aus [1] bekannte Permeationsebene weist eine elektrisch leitfähige Schicht auf, die von einer porösen Schutzschicht umgeben ist. An die elektrisch leitfähige Schicht ist eine
35 elektrische Spannung anlegbar.

Die in [1] beschriebene Biochip-Anordnung macht sich die Tatsache zunutze, dass viele Bio-Moleküle wie Proteine oder DNA elektrisch geladen sind. So sind bei Proteinen auf der Proteinoberfläche abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums bestimmte Aminosäuren positiv, andere negativ geladen, so dass Proteine in der Summe entweder positiv oder negativ elektrisch geladen sein können. Auch DNA-Moleküle weisen bei physiologischen pH-Werten (pH 6 bis pH 9) regelmäßig eine negative elektrische Ladung auf.

Wird an die Permeationsschicht eine elektrische Spannung geeigneten Vorzeichens angelegt, so bewegen sich die Bio-Moleküle entsprechend ihrer elektrischen Ladung infolge Elektrophorese auf die Permeationsschicht zu, um sich in der direkten Umgebung der Permeationsschicht zu akkumulieren. Das Prinzip der Elektrophorese bei Bio-Molekülen ist beispielsweise in [2] beschrieben. Wie bereits oben angesprochen, sind DNA-Moleküle in der Regel negativ geladen. Legt man an die Permeationsschicht eine positive Spannung an, so wird auf die DNA-Moleküle eine elektrisch anziehende Kraft ausgeübt, und die DNA-Moleküle werden sich in der Umgebung der Permeationsschicht ansammeln. Es findet daher eine Erhöhung der Konzentration der DNA-Halbstränge in der Nähe der Permeationsebene und daher in einem Umgebungsbereich der aktiven Sensorfläche statt. Aufgrund Diffusion gelangen die DNA-Halbstränge zu den Fängermolekülen. Aufgrund der erhöhten DNA-Konzentration verläuft die Hybridisierung infolge der an die Permeationsebene angelegten elektrischen Spannung nun schneller und effektiver.

Allerdings ist zu betonen, dass DNA-Moleküle zersetzt werden können, wenn sie in direkten Kontakt mit freien Ladungsträgern an der Oberfläche einer Elektrode geraten. Daher können DNA-Moleküle und andere empfindliche Bio-Moleküle zerstört werden, wenn sie mit der elektrisch leitfähigen Schicht der Permeationsschicht in Kontakt geraten. Gemäß der aus [1] bekannten Biochip-Anordnung ist

eine poröse Schutzschicht um die elektrisch leitfähige Kernschicht der Permeationsschicht vorgesehen. Diese poröse Schutzschicht um den elektrisch leitfähigen Kern der Permeationsschicht ist nur für die Ionen des Elektrolyten durchlässig, wohingegen Moleküle oberhalb einer vorgegebenen Größe die poröse Schutzschicht nicht durchdringen können. Daher können biologische Makromoleküle wie DNA-Halbstränge oder Proteine die poröse Schutzschicht nicht durchdringen, so dass die empfindlichen Bio-Moleküle durch die poröse Schutzschicht vor einem direkten Kontakt mit der elektrisch leitfähigen Schicht der Permeationsschicht geschützt sind. Daher sind die Bio-Moleküle vor einer Zersetzung geschützt.

Auch die aus [1] bekannte Biochip-Anordnung mit einigen Nachteilen behaftet. So ist die Integration der Permeationsebene direkt auf dem Chip technologisch schwierig und aufwendig. Um ihre bestimmungsgemäße Funktion zu gewährleisten, muss eine ausreichend große Fläche des Chips mit der Permeationsschicht versehen sein. Dieser Flächenbedarf geht auf Kosten der Interdigitalelektroden. Daher verringert das Bereitstellen der Permeationsschicht auf dem Chip die für die Interdigitalelektroden zur Verfügung stehende aktive Sensorfläche. Daher ist die aktive Oberfläche, an denen Fängermoleküle immobilisiert werden können, durch das Vorhandensein der Permeationsschicht reduziert. Dies ist mit einem Verlust an Nachweissensitivität verbunden. Die Ansprechzeit, die bis zu einer Hybridisierung der nachzuweisenden Molekülen mit den Fängermolekülen abgeartet werden muss, wird dadurch erhöht.

Weiterhin ist in [3] ein Verfahren zum Durchführen von Reaktionen zwischen mindestens zwei Reaktionspartnern, insbesondere Bio-Molekülen, beschrieben, bei dem mindestens ein Bio-Molekül Reaktionsbereiche mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchläuft und mindestens ein Reaktionspartner, beispielsweise ein Feature eines Bio-Chips,

immobilisiert ist, und bei dem die Reaktionsgemische hydrodynamisch bewegt werden.

Der Erfindung liegt das Problem zugrunde, eine Biochip-
5 Anordnung mit einer erhöhten Nachweisempfindlichkeit bereitzustellen.

Das Problem wird durch eine Biochip-Anordnung mit den Merkmalen gemäß dem unabhängigen Patentanspruch gelöst.

10

Die Biochip-Anordnung der Erfindung weist auf ein Substrat, mindestens einen auf oder in dem Substrat angeordneten Sensor, und eine elektrisch leitfähige Permeationsschicht, die in einem vorgegebenen, von Null verschiedenen Abstand von
15 der Oberfläche des Substrats angeordnet ist, und an die eine elektrische Spannung-anlegbar ist.

Indem die elektrisch leitfähige Permeationsschicht in einem von Null verschiedenen Abstand von der Oberfläche des
20 Substrats angeordnet ist, ist es erfindungsgemäß entbehrlich, die Permeationsschicht auf bzw. in dem Chip zu integrieren. Daher ist es verfahrenstechnologisch gegenüber dem Stand der Technik vereinfacht, die Biochip-Anordnung der Erfindung herzustellen. Gegenüber dem Stand der Technik ist bei der
25 Herstellung der Biochip-Anordnung insbesondere der Verfahrensschritt, die Permeationsschicht auf dem Chip zu befestigen, eingespart. Dadurch sind die Kosten und der Zeitaufwand bei der Herstellung der Anordnung verringert.

30 Auch ist das räumliche Trennen der Permeationsschicht von dem Substrat mit dem weiteren Vorteil verbunden, dass die Permeationsschicht auf der Substratoberfläche keinerlei Fläche in Anspruch nimmt. Damit ist erfindungsgemäß ein parasitärer Flächenverbrauch der Permeationsschicht auf
35 Kosten der aktiven Sensorfläche vermieden. Gemäß der Biochip-Anordnung der Erfindung ist es möglich, die gesamte Oberfläche des Substrats mit Sensoren zu versehen, was mit

einer erhöhten Nachweissensitivität einhergeht. Die aktive Fläche auf dem Substrat ist gegenüber dem Stand der Technik erhöht. Dadurch ist es erfindungsgemäß möglich, auch geringere Konzentrationen von Bio-Molekülen nachzuweisen bzw.
5 die Nachweiszeit zu verringern.

Gemäß einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung weist die Biochip-Anordnung ferner einen Abstandshalter auf, der zwischen dem Substrat und der Permeationsschicht
10 angeordnet ist, und dessen Dicke gleich dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht von der Oberfläche des Substrats ist.

Durch die Dicke des Abstandshalters ist daher der Abstand
15 zwischen der Permeationsschicht und der Oberfläche des Substrats exakt vorgebar, wobei vorzugsweise der Abstandshalter eine Dicke zwischen ungefähr 1 μm und ungefähr 2 μm aufweist. Die Dicke des Abstandshalters ist auf die Bedürfnisse des Einzelfalles flexibel einstellbar. Der
20 Abstandshalter ist aus einem beliebigen, kostengünstigen Material herstellbar, was die Herstellungskosten der Biochip-Anordnung gering hält.

Die Biochip-Anordnung kann ferner eine Begrenzungseinrichtung
25 aufweisen, wobei die Begrenzungseinrichtung entlang eines geschlossenen Weges auf der Permeationsschicht derart angeordnet ist, dass durch die Begrenzungsvorrichtung und die Permeationsschicht ein Hohlraum ausgebildet wird.

30 In dem durch die Begrenzungseinrichtung und die Permeationsschicht ausgebildeten Hohlraum kann eine zu untersuchende Flüssigkeit bequem eingefüllt werden. Die Dimensionen der Begrenzungseinrichtung können flexibel auf die im Einzelfall zur Verfügung stehenden Volumina einer zu
35 untersuchenden Flüssigkeiten justiert werden. Daher ist die Biochip-Anordnung der Erfindung auch für Anwendungen mit sehr

kleinen Volumina geeignet, wie sie in der Biochemie häufig auftreten.

Die Begrenzungseinrichtung kann wiederum aus einem beliebigen Material hergestellt sein, beispielsweise aus einem
5 kostengünstigen Plastik- oder Plexiglasmaterial. Dies hält die Kosten für die Herstellung der Biochip-Anordnung gering.

Gemäß bevorzugter Ausgestaltungen der Erfindung sind sowohl
10 der Abstandshalter als auch die Begrenzungseinrichtung voneinander unabhängig im Wesentlichen hohlzylinderförmig ausgebildet. Vorzugsweise sind der Abstandshalter und/oder die Begrenzungseinrichtung aus einem elektrisch
nichtleitfähigen Material hergestellt. Dieses Material kann
15 insbesondere eines oder eine Kombination der Materialien Glas, Plexiglas, Polyimid, Polycarbonat, Polyethylen, Polypropylen oder Polystyrol sein.

Ferner kann die Biochip-Anordnung der Erfindung mindestens
20 einen weiteren Abstandshalter aufweisen, wobei jeder der weiteren Abstandshalter zwischen dem Substrat der Permeationsschicht angeordnet ist, und wobei die Dicke jedes der weiteren Abstandshalter gleich dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht von der Oberfläche des Substrats ist.

25 Anschaulich können die weiteren Abstandshalter als Stützvorrichtungen für die Permeationsschicht dienen. Die Permeationsschicht ist gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auf dem im Wesentlichen hohlzylinderförmigen bzw. ringförmigen Abstandshalter
30 angeordnet. Wenn im Inneren des ringförmigen Abstandshalters mindestens ein weiterer Abstandshalter vorgesehen ist, deren Dicke gleich dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht von der Oberfläche des Substrats ist, so kann der mindestens eine weitere Abstandshalter die Permeationsschicht zusätzlich
35 mechanisch stabilisieren. Auf diese Weise kann die Biochip-Anordnung zusätzlich stabilisiert werden, so dass sie für den robusten Laboreinsatz geeignet ist.

Gemäß einer Ausgestaltung der Erfindung weist der mindestens eine Sensor mindestens eine Elektrode auf, wobei jede der Elektroden mit elektrischen Kontaktierungen koppelbar ist.

- 5 Ferner weist die Biochip-Anordnung gemäß einer Ausgestaltung der Erfindung eine Vielzahl von Fängermolekülen auf, die mit mindestens einer der Elektroden gekoppelt sind. Zusätzlich kann die Biochip-Anordnung mindestens eine elektrische Kontaktierung aufweisen, wobei mindestens eine der Elektroden
10 mit mindestens einer der Kontaktierungen gekoppelt ist, so dass an den elektrischen Kontaktierungen mindestens ein Signal abnehmbar ist.

- Anschaulich sind die Fängermoleküle auf der Oberfläche der
15 Elektroden immobilisiert. Wird in die Biochip-Anordnung eine zu untersuchende Flüssigkeit eingefüllt, die möglicherweise zu den an der Elektrode immobilisierten Fängermolekülen komplementäre Moleküle aufweist, so hybridisieren diese Moleküle, beispielsweise DNA-Halbstränge, mit den
20 Fängermolekülen. Dies beeinflusst in charakteristischer Weise einen elektrisch erfassbaren Parameter, beispielsweise die zwischen den Elektroden abnehmbare Kapazität. Auf diese Weise ist die Biochip-Anordnung der Erfindung als Sensor für Bio-Moleküle, beispielsweise als DNA-Sensor verwendbar.

- 25 Jede der mindestens eine Elektrode ist aus einem elektrisch leitfähigen Material hergestellt, beispielsweise einem metallischen Material. Vorzugsweise ist die Elektrode aus Goldmaterial hergestellt. Die Fängermoleküle können
30 Nukleinsäuren (DNA- oder RNA-Halbstränge), Peptide, Proteine, niedermolekulare Verbindungen oder alternativ ein anderes geeignetes Molekül sein.

- Die Immobilisierung der Fängermoleküle auf der mindestens
35 eine Elektrode erfolgt vorzugsweise mittels einer Gold-Schwefel-Kopplung. Dafür ist es erforderlich, dass die Fängermoleküle in einem ihrer Endabschnitte eine

schwefelhaltige Gruppe aufweisen, beispielsweise eine Thiol-Gruppe (SH). Die Biochip-Anordnung ist allerdings keineswegs auf das Materialpaar Gold-Schwefel begrenzt. Es kann auch jedes andere geeignete Materialpaar für die Immobilisierung der Fängermoleküle auf der Elektrode verwendet werden. Voraussetzung ist, dass sich zwischen den Molekülen und dem Leitermaterial eine chemische Bindung ausbildet. Neben der bereits angesprochenen Gold-Thiol-Bindung gibt es eine Vielzahl weiterer geeigneter Kombinationen, beispielsweise binden Thiol-Gruppen auch an Platin oder Silber, Trichlorosilane haften an verschiedenen Oxiden, die als dünne Oberflächenschicht auf der elektrisch leitfähigen Schicht vorgesehen sein können. Trichlorosilane (SiCl_3 -Gruppen) haften allerdings auch an Silizium, Aluminium und Titan.

Die Biochip-Anordnung kann ferner eine Referenzelektrode aufweisen, derart, dass zwischen die Permeationsschicht und die Referenzelektrode eine elektrische Spannung anlegbar ist. Die Referenzelektrode wird in die zu untersuchende Flüssigkeit (in der Regel eine elektrolytische Flüssigkeit) eingetaucht.

Um zwischen die Permeationsschicht und die Referenzelektrode eine elektrische Spannung anlegen zu können, weist die Permeationsschicht einen Kern auf, der aus einem elektrisch leitfähigen Material hergestellt ist. Das elektrisch leitfähige Material der Permeationsschicht kann insbesondere ein Metall oder ein Halbleiter sein. Vorzugsweise ist das elektrisch leitfähige Material der Permeationsschicht Gold.

Wie weiter-oben ausgeführt wurde, sind Bio-Moleküle oftmals sehr empfindliche Makromoleküle, die nur unter bestimmten biologisch-chemischen bzw. physikalischen Bedingungen ausreichend stabil sind. So denaturieren beispielsweise Proteine oberhalb einer bestimmten Temperatur bzw. außerhalb eines bestimmten Bereichs von pH-Werten. DNA-Halbstränge sind besonders sensitiv auf freie elektrische Ladungen. Daher

können DNA-Halbstränge zersetzt werden, wenn sie mit einer metallischen Elektrode in direkten Kontakt gelangen, wenn an dieser metallischen Elektrode freie elektrische Ladungen vorhanden sind. Aus diesem Grund ist der aus einem elektrisch leitfähigen Material hergestellte Kern der Permeationsschicht von einer aus einem porösen Material hergestellten Hülle umgeben.

Das poröse Material der Permeationsschicht weist Poren einer vorgebbaren Größe auf, derart, dass Moleküle, deren Größe kleiner oder gleich der vorbestimmten Porengröße ist, durch das poröse Material hindurchdiffundieren können, wohingegen Moleküle, deren Größe die vorbestimmte Porengröße übersteigt, nicht durch das poröse Material hindurchdiffundieren können.

Dadurch ist es den üblicherweise volumenmäßig kleinen Elektrolytmolekülen möglich, durch die poröse Schutzschicht auf die elektrisch leitfähige Schicht hin zu diffundieren, wohingegen auf freie elektrische Ladungsträger empfindliche Bio-Moleküle wie DNA-Halbstränge aufgrund ihrer großen Molekülausdehnung nicht durch die poröse Schutzschicht hindurchdiffundieren können. Dadurch sind die empfindlichen Bio-Moleküle von der elektrisch leitfähigen Schicht der Permeationsschicht entkoppelt und vor freien elektrischen Ladungen geschützt.

Zum Erfassen von biologischen Makromolekülen ist zunächst in den durch die Begrenzungseinrichtung und die Permeationsschicht definierten Hohlraum die zu untersuchende Flüssigkeit einzufüllen. Wird nun zwischen die Permeationsschicht und die Referenzelektrode eine elektrische Spannung geeigneten Vorzeichens angelegt, so wird dadurch in der zu untersuchenden Flüssigkeit ein elektrisches Feld erzeugt. Dieses elektrische Feld übt auf die in der zu untersuchenden Flüssigkeit enthaltenen Bio-Moleküle, sofern diese elektrisch geladen sind, eine elektrische Kraft aus. Befindet sich beispielsweise die Permeationsschicht auf einem elektrisch positiven Potential, so werden die üblicherweise

negativ geladenen DNA-Halbstränge von der Permeationsschicht elektrisch angezogen. Dadurch erhöht sich in einer Umgebung der Permeationsschicht die Konzentration der DNA-Halbstränge im Vergleich zur Durchschnittskonzentration der DNA-

5 Halbstränge in der eingefüllten Flüssigkeit.

Der mindestens eine Sensor auf der Oberfläche des Substrats ist in einem zwar von Null verschiedenen, jedoch ausreichend gering einstellbaren Abstand von der Permeationsschicht

10 angeordnet. Die Konzentrationserhöhung der nachzuweisenden Moleküle erreicht nahe der Permeationsschicht ein Maximum und fällt mit zunehmendem Abstand von der Permeationsschicht ab. Je geringer der Abstand eingestellt ist, umso stärker wirkt sich die durch die Permeationsschicht hervorgerufene

15 Konzentrationserhöhung auch auf die Konzentration der Bio-Moleküle an der aktiven Sensoroberfläche aus. Daher ist auch in einer direkten Umgebung der Sensoren erfindungsgemäß die Konzentration der nachzuweisenden Bio-Moleküle erhöht. Diese Konzentrationserhöhung der nachzuweisenden Bio-Molekülen geht
20 mit einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit bzw. mit einer Reduzierung der für die Hybridisierung erforderlichen charakteristischen Ansprechzeit einher.

Die Biochip-Anordnung der Erfindung weist einen sehr

25 einfachen Aufbau auf, so dass die Herstellung billig und wenig zeitaufwändig ist.

Die Permeationsschicht der Biochip-Anordnung ist derart eingerichtet, dass sie von den Bio-Molekülen durchdrungen werden kann. Dies ist erfindungsgemäß erforderlich, um die nachzuweisenden Moleküle in direkten Wirkkontakt mit den an der Oberfläche der Sensoren angeordneten Fängermolekülen zu bringen. Dies kann realisiert sein, indem die

30 Permeationsschicht der Erfindung als ein Gitternetz ausgestaltet ist. Anschaulich besteht ein solches Gitternetz aus in zwei zueinander orthogonalen Richtungen gespannten Drähten. Die durch diese Drähte definierten Maschen des

Gitternetzes sind ausreichend groß zu wählen, um die nachzuweisenden Bio-Moleküle in direktem Kontakt mit den auf den Elektroden angeordneten Fängermolekülen bringen zu können. Mit anderen Worten müssen die Bio-Moleküle durch die Maschen des Gitternetzes hindurchgelangen können. Vorzugsweise sind die Drähte des Gitternetzes voneinander in einem Abstand von ungefähr 100 nm angeordnet.

Gemäß einem bevorzugten Ausführungsbeispiel können die Drähte aus einem elektrisch leitfähigen Kern und einer darum herum angebrachten porösen Hüllschicht hergestellt sein. Beispielsweise kann zunächst ein Gitternetz aus einem metallischen Material hergestellt werden und dieses dann in ein Bad eingetaucht werden, welches Bad das Material aufweist, das eine poröse Hüllschicht um das Gitternetz ausbilden kann. Ein solches Gitternetz ist kostengünstig und einfach herstellbar.

Gemäß einer Ausgestaltung der Erfindung kann die Biochip-Anordnung eine Mehrzahl von elektrisch leitfähigen Permeationsschichten aufweisen, die in einem vorgegebenen Abstand voneinander und im Wesentlichen parallel zueinander angeordnet sind, wobei an jeder der Permeationsschichten jeweils eine elektrische Spannung anlegbar ist. Indem statt einer Permeationsschicht mehrere hintereinander geschaltete Permeationsschichten verwendet werden und mit entsprechenden elektrischen Spannungen beschaltet werden, kann die Konzentration der nachzuweisenden Moleküle, beispielsweise DNA-Halbstränge, von Permeationsebene zu Permeationsebene sukzessive erhöht werden. Dies vergrößert zusätzlich die Sensitivität des DNA-Sensors und reduziert die für die Hybridisierung erforderliche Ansprechzeit.

Die Biochip-Anordnung kann beispielsweise als DNA-Sensor verwendet werden. Ein solcher DNA-Sensor weist beispielsweise ein Substrat auf, auf welchem Substrat ein Polyimidring als Abstandshalter zur aktiven Kontaktebene vorgesehen ist. Die

Kontaktebene ist die Oberfläche des Substrats, die mit mindestens einem Sensor versehen ist. Wie weiter oben ausgeführt, kann ein solcher Sensor als Goldelektrode mit daran immobilisierten Fängermolekülen ausgestaltet sein. Die

5 Dicke des Polyimidrings beträgt beispielsweise 1 μm bis 2 μm . Eine maximale Stabilität des Permeationsnetzes, das auf dem Polyimidring ausgebildet ist, kann erreicht werden, indem zusätzliche Abstandshalter als Stützpunkte aus Polyimid vorgesehen sind. Als Begrenzungseinrichtung ist gemäß dem

10 beschriebenen Ausführungsbeispiel eine Plexiglasröhre verwendet. Die Plexiglasröhre kann mit dem Permeationsnetz verklebt sein, und diese mit dem Permeationsnetz verklebte Plexiglasröhre kann auf den Polyimidring aufgedrückt und mit diesem verklebt sein. Der Polyimidring ist auf der Oberfläche

15 des Substrats befestigt, beispielsweise verklebt. Das Permeationsnetz ist sehr nahe an der Kontaktebene der Fängermoleküle angeordnet. Wird nun zwischen das Permeationsnetz und eine Referenzelektrode eine elektrische Spannung geeigneten Vorzeichens angelegt, so wird erreicht,

20 dass sich infolge Elektrophorese die Konzentration von in der zu untersuchenden Flüssigkeit enthaltenen DNA-Halbsträngen in der Umgebung der Permeationsebene erhöht. Durch Hintereinanderschalten mehrerer parallel angeordneter Permeationsebenen und Anlegen entsprechender Spannungen an

25 jede der Permeationsebenen ist eine sukzessive Konzentrationserhöhung von Permeationsschicht zu Permeationsschicht erreichbar.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in den Figuren

30 dargestellt und werden im Weiteren näher erläutert.

Es zeigen:

Figur 1A eine Querschnittsansicht einer Biochip-Anordnung

35 gemäß dem Stand der Technik,

Figur 1B eine andere Querschnittsansicht einer Biochip-Anordnung gemäß dem Stand der Technik,

Figur 2A eine Draufsicht einer Biochip-Anordnung mit Interdigitalelektroden gemäß dem Stand der Technik,

Figur 2B eine Querschnittsansicht entlang einer Linie I-I' der in Figur 2A gezeigten Biochip-Anordnung mit Interdigitalelektroden gemäß dem Stand der Technik,

Figur 3A eine Querschnittsansicht einer Biochip-Anordnung gemäß einem ersten Ausführungsbeispiel der Erfindung,

Figur 3B eine Querschnittsansicht einer Biochip-Anordnung gemäß einem zweiten Ausführungsbeispiel der Erfindung,

Figur 3C eine Querschnittsansicht einer Biochip-Anordnung gemäß einem dritten Ausführungsbeispiel der Erfindung,

Figur 4A eine Querschnittsansicht einer Biochip-Anordnung gemäß einem vierten Ausführungsbeispiel der Erfindung,

Figur 4B eine Draufsicht der in Figur 4A gezeigten Biochip-Anordnung gemäß dem vierten Ausführungsbeispiel der Erfindung.

In Fig. 3A ist eine Biochip-Anordnung gemäß einem ersten Ausführungsbeispiel der Erfindung gezeigt. Die Biochip-Anordnung 300 weist auf ein Substrat 301, mindestens einen auf oder in dem Substrat 301 angeordneten Sensor 302 und eine elektrisch leitfähige Permeationsschicht 303, die in einem vorgegebenen, von Null verschiedenen Abstand (dieser Abstand ist in Fig. 3A mit einem Doppelpfeil symbolisiert, der mit „d“ gekennzeichnet ist) von der Oberfläche des Substrats 301

angeordnet ist, und an die eine elektrische Spannung anlegbar ist.

Gemäß dem in **Fig. 3A** gezeigten Ausführungsbeispiel weist die Biochip-Anordnung 300 vier Sensoren 302 auf. Die vier Sensoren 302 sind auf dem Substrat 301 aufgebracht. Alternativ ist es erfindungsgemäß möglich, die Sensoren 302 in einem Oberflächenabschnitt des Substrats 301 anzubringen, beispielsweise können die Sensoren 302 als integrierte Schaltkreiselemente in einem Halbleitersubstrat 301 eingebracht sein. Das Substrat 301 kann beispielsweise ein Halbleiterwafer (etwa aus Silizium hergestellt) sein, es kann eine Siliziumdioxidscheibe sein oder eine Scheibe aus einem beliebigen anderen geeigneten Material. So kann das Substrat 301 beispielsweise auch ein Glasplättchen sein.

Gemäß dem in **Fig. 3B** gezeigten Ausführungsbeispiel der Biochip-Anordnung 310 weist diese zusätzlich zu der in **Fig. 3A** gezeigten Biochip-Anordnung 300 einen Abstandshalter 304 auf, der zwischen dem Substrat 301 und der Permeationsschicht 303 angeordnet ist, und dessen Dicke d (vgl. **Fig. 3B**) gleich dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht 303 von der Oberfläche des Substrats 301 ist. Durch geeignete Wahl der Dicke des Abstandshalters 304 ist der Abstand zwischen der Permeationsschicht 303 und der aktiven Sensoroberfläche auf dem Substrat 301 vorgebbar. Gemäß diesem Ausführungsbeispiel weist der Abstandshalter 304 eine Dicke, d , gerechnet ausgehend von der Oberfläche 301a des Substrats 301 bis zu der unteren Oberfläche 303a der Permeationsschicht 303 von ungefähr $1\text{ }\mu\text{m}$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$ auf.

Der Abstandshalter 304 ist vorzugsweise entlang eines geschlossenen Weges auf dem Substrat 301 derart angeordnet, dass durch den Abstandshalter 304 und das Substrat 301 ein Hohlraum 303b ausgebildet wird. Insbesondere kann der Abstandshalter 304 im wesentlichen hohlzylinderförmig ausgebildet sein. Alternativ kann der Abstandshalter 304 in

einer Draufsicht aber auch als Rechteck oder eine andere geometrische Figur ausgestaltet sein. Der Abstandshalter 304 kann alternativ so geformt sein, wie das für einen bestimmten Anwendungsfall am günstigsten ist. Der Abstandshalter 304 ist vorzugsweise aus einem elektrisch nicht leitfähigen Material hergestellt, beispielsweise aus einem oder einer Kombination der Materialien Glas, Plexiglas, Polyimid, Polycarbonat, Polyethylen, Polypropylen oder Polystyrol. Der Abstandshalter 304 ist auf dem Substrat 301 befestigt. Der Abstandshalter 304 kann insbesondere auf dem Substrat 301 aufgeklebt sein. Alternativ ist es möglich, dass der Abstandshalter 304 durch ein halbleitertechnisches Verfahren auf die Substratoberfläche aufgebracht wird. So kann beispielsweise eine Schicht des Materials, aus dem der Abstandshalter 304 herzustellen ist, auf die Substratoberfläche aufgebracht und mittels Photostrukturierens der Abstandshalter 304 auf dem Substrat 301 ausgebildet werden.

Ferner ist der Abstandshalter 304 an der Permeationsschicht 303 befestigt. Gemäß diesem Ausführungsbeispiel ist der Abstandshalter 304 mit der Permeationsschicht 303 verklebt. Die Biochip-Anordnung 310, die in Fig. 3B gezeigt ist, weist ferner eine Begrenzungseinrichtung 305 auf, wobei die Begrenzungseinrichtung 305 entlang eines geschlossenen Weges auf der Permeationsschicht 303 derart angeordnet ist, dass durch die Begrenzungsvorrichtung 305 und die Permeationsschicht 303 ein weiterer Hohlraum 303c ausgebildet ist.

Gemäß diesem Ausführungsbeispiel ist die Begrenzungseinrichtung 305 im Wesentlichen hohlzylinderförmig bzw. ringförmig ausgestaltet. Die Begrenzungseinrichtung 305 ist aus einem elektrisch nicht leitfähigen Material wie beispielsweise Glas, Plexiglas, Polyimid, Polycarbonat, Polyethylen, Polypropylen oder Polystyrol hergestellt. Die Begrenzungseinrichtung 305 kann alternativ aus einer Kombination der genannten Materialien hergestellt sein, oder

- kann alternativ aus einem anderen geeigneten Material hergestellt sein. Da durch die Permeationsschicht 303 und die Begrenzungseinrichtung 305 ein Hohlraum ausgebildet ist, kann in diesen Hohlraum eine zu untersuchende Flüssigkeit
- 5 eingefüllt werden. Beispielsweise kann mit einer Kanüle oder einer Pipette in den Hohlraum die zu untersuchende Flüssigkeit eingefüllt sein. Wie in **Fig. 3B** gezeigt, weist auch die Begrenzungseinrichtung 305 eine charakteristische Höhe auf. Durch geeignetes Wählen dieser Höhe der
- 10 Begrenzungseinrichtung 305 ist die Biochip-Anordnung 310 flexibel auf die Bedürfnisse des Einzelfalls einstellbar. Oftmals sind mit einer Biochip-Anordnung 310 zu untersuchende biologische Proben in nur geringen Volumina vorliegend. Entsprechend einem vorgegebenen Volumen einer zu
- 15 untersuchenden Flüssigkeit ist die Begrenzungseinrichtung 305 mit einem geeigneten Höhe wählbar. Die Begrenzungseinrichtung 305 ist auf der Permeationsschicht 303 befestigt, indem sie auf der Permeationsschicht 303 aufgeklebt ist.
- 20 In **Fig. 3C** ist eine Biochip-Anordnung 320 gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung gezeigt.

- Gemäß der in **Fig. 3C** gezeigten Biochip-Anordnung 320 weist der mindestens eine Sensor 302 aus **Fig. 3A, Fig. 3B**
- 25 mindestens eine Elektrode 306 auf, wobei jede Elektrode 306 mit elektrischen Kontaktierungen 307, 308 koppelbar ist. Gemäß dem in **Fig. 3C** gezeigten Ausführungsbeispiel ist jede der Elektroden 306 mit einer ersten elektrischen
- 30 Kontaktierung 307 bzw. mit einer zweiten elektrischen Kontaktierung 308 gekoppelt. Wie in **Fig. 3C** gezeigt, ist zwischen der ersten elektrischen Kontaktierung 307 und der zweiten elektrischen Kontaktierung 308 ein Signal abnehmbar. Gemäß dem in **Fig. 3C** gezeigten Ausführungsbeispiel wird dieses Signal von einem Mittel zum Erfassen eines
- 35 elektrischen Signals 309 erfasst. Das Mittel zum Erfassen eines elektrischen Signals 309 kann ein Voltmeter sein. Ferner weist die Biochip-Anordnung 320 eine Vielzahl von

Fängermolekülen 311 auf, die mit den Elektroden 306 gekoppelt sind. Darüber hinaus weist die Biochip-Anordnung von **Fig. 3C** eine Referenzelektrode 312 auf. Zwischen die Referenzelektrode 312 und die Permeationsschicht 303 ist eine elektrische Spannung 313 anlegbar. Die elektrische Spannung 313 ist nach Betrag und Vorzeichen frei wählbar. In **Fig. 3C** ist eine zu untersuchende elektrolytische Flüssigkeit 314 schematisch dargestellt, die mittels der Biochip-Anordnung 320 auf das Vorhandensein eines bestimmten Bio-Moleküls, beispielsweise eines bestimmten DNA-Halbstrangs, untersucht werden kann.

In der zu untersuchenden Flüssigkeit 314 sind möglicherweise nachzuweisende Bio-Moleküle enthalten (in **Fig. 3C** nicht gezeigt). Ferner ist mittels einer Einfüllvorrichtung (in **Fig. 3C** nicht gezeigt) eine zu untersuchende Flüssigkeit 314 in die Biochip-Anordnung 320 einfüllbar. Eine solche Einfüllvorrichtung kann beispielsweise eine Pipette oder eine Kanüle sein.

20

Darüber hinaus ist in **Fig. 3C** ein weiterer Abstandshalter 315 gezeigt. Dieser ist wie der Abstandshalter 304 zwischen dem Substrat 301 und der Permeationsschicht 303 angeordnet. Die Dicke des weiteren Abstandshalters 315 ist gleich dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht 303 von der Oberfläche des Substrats 301, d.h. wie in **Fig. 3C** angedeutet, erfüllt der Abstandshalter 304 vorwiegend zwei Funktionen. Einerseits hält der Abstandshalter 304 den durch seine Dicke vorgebbaren Abstand zwischen dem Substrat 301 und der Permeationsschicht 303 aufrecht. Darüber hinaus dient der Abstandshalter 304 der mechanischen Stabilisierung der Permeationsschicht 303 entlang des Umfangs der beispielsweise im wesentlichen kreisförmig ausgestalteten Permeationsschicht 303. Ist der Abstandshalter 304 im wesentlichen ring- oder hohlzylinderförmig ausgebildet, so kann allerdings in einem zentralen Abschnitt der Permeationsschicht 303 diese möglicherweise nicht ausreichend mechanisch stabilisiert

sein. Zu diesem Zweck ist gemäß dem in **Fig. 3C** gezeigten Ausführungsbeispiel der weitere Abstandshalter 315 vorgesehen, der die in Wesentlichen kreisförmige Permeationsschicht 303 in einem Mittelabschnitt stabilisiert.

5 Alternativ zu dem in **Fig. 3C** gezeigten Ausführungsbeispiel können auch mehrere weitere Abstandshalter 315 vorgesehen sein, um die Permeationsschicht 303 an weiteren Stellen mechanisch zu stabilisieren. Auch kann der mindestens eine weitere Abstandshalter 315 dazu dienen, auch in einem
10 Mittenabschnitt der Permeationsschicht 303 den konstanten Abstand zwischen dem Substrat 301 und der Permeationsschicht 303 aufrecht zu erhalten. Dies kann erforderlich sein, wenn die Permeationsschicht 303 aufgrund ihres Eigengewichtes oder des Gewichtes der auf der Permeationsschicht 303 angeordneten
15 zu untersuchenden Flüssigkeit 314 infolge der Gravitationskraft nach unten durchhängt. Der mindestens eine weitere Abstandshalter 315 kann in diesem Fall die im wesentlichen planare Struktur der Permeationsschicht 303 aufrechterhalten.

20 Die in **Fig. 3C** gezeigte Permeationsschicht 303 weist einen Kern auf, der aus einem elektrisch leitfähigen Material hergestellt ist. Die Permeationsschicht 303 weist ferner einen Kern umgebende Hülle auf, die aus einem porösen Material
25 hergestellt ist. Das poröse Material der Permeationsschicht 303 weist Poren einer vorbestimmten Größe auf, derart, dass Moleküle, deren Größe kleiner oder gleich der vorbestimmten Porengröße ist, durch das poröse Material hindurchdiffundieren können, wohingegen Moleküle, deren Größe
30 die vorbestimmte Porengröße übersteigt, nicht durch das poröse Material hindurchdiffundieren können.

Um die in einer zu untersuchenden Flüssigkeit 314 möglicherweise enthaltenen empfindlichen Bio-Moleküle,
35 beispielsweise DNA-Halbstränge, vor Zerstörung zu schützen, ist der aus einem elektrisch leitfähigen Material hergestellte Kern der Permeationsschicht 303 mit der porösen

- Schutzschicht umgeben. Diese Schutzschicht ist von kleinen Molekülen und Ionen durchdringbar, wohingegen sie von großen Molekülen wie den zu untersuchenden empfindlichen Bio-Molekülen nicht durchdringbar ist. Indem durch Wahl des Materials der porösen Umhüllung der Permeationsschicht 303 die Porengröße einstellbar ist, kann determiniert werden, welche Moleküle durch die poröse Schutzschicht hindurchdiffundieren können und welche nicht.
- 10 Das elektrisch leitfähige Material der Permeationsschicht 303 ist vorzugsweise ein Metall oder ein Halbleiter. Es kann allerdings auch jedes andere leitfähige Material sein, beispielsweise elektrisch leitfähige Polymere. Vorzugsweise ist das elektrisch leitfähige Material der Permeationsschicht 15 303 Gold-Material.

- Bei der Biochip-Anordnung 320 ist die Permeationsschicht 303 gemäß diesem Ausführungsbeispiel der Erfindung als ein Gitternetz ausgestaltet. Ein solches Gitternetz ist aus in zwei zueinander orthogonalen Richtungen parallel gespannten elektrischen leitfähigen Drähten gebildet, die von einem porösen Material ummantelt sind. Durch die Drähte des Gitternetzes, die voneinander beispielsweise in einem Abstand von ungefähr 100 nm angeordnet sind, werden Maschen 25 ausgebildet, deren Dimension so voreingestellt ist, dass die Maschen von den möglicherweise in der zu untersuchenden Flüssigkeit 314 enthaltenen, nachzuweisenden Bio-Molekülen aufgrund deren Größe durchdrungen werden können.

- 30 Der Nachweis der Bio-Moleküle erfolgt durch Anbinden an die Fängermoleküle 311, welche Fängermoleküle 311 an der Oberfläche der Elektroden 306 immobilisiert sind. Um dort anbinden zu können, müssen die nachzuweisenden Bio-Moleküle in Wirkkontakt mit den Fängermolekülen 311 gelangen. Wie in 35 Fig. 3C gezeigt, müssen die Bio-Moleküle hierzu zunächst die Permeationsschicht 303 durchdringen, was beispielsweise durch

die Ausgestaltung der Permeationsschicht 303 als Gitternetz realisiert werden kann.

Weiter ist es für die Funktionalität der Biochip-Anordnung 320 erforderlich, dass eine elektrische Spannung 313 zwischen die Permeationsschicht 303 und die Referenzelektrode 312 angelegt wird. Ist die elektrische Spannung 313 so gewählt, dass die Permeationsschicht infolge der elektrischen Spannung elektrisch positiv aufgeladen ist, so werden in der zu untersuchenden Flüssigkeit 314 enthaltene elektrisch negativ geladene, nachzuweisende Bio-Moleküle durch eine elektrische Kraft von der Permeationsschicht 303 angezogen und bewegen sich daher auf die Permeationsschicht 303 zu (Elektrophorese). So sind beispielsweise DNA-Halbstränge unter physiologischen pH-Werten (ungefähr pH-Wert 6 bis pH-Wert 9) in Lösung elektrisch negativ geladen. Eine auf positive elektrische Spannung befindliche Permeationsschicht 303 ist daher geeignet, negativ geladene DNA-Halbstränge in der Umgebung der Permeationsschicht 303 zu akkumulieren. Durch die Konzentrationserhöhung der nachzuweisenden Moleküle in der Umgebung der Permeationsschicht 303 bzw. in der Umgebung der Fängermoleküle 311 ist die Nachweisempfindlichkeit der Biochip-Anordnung 320 für zu untersuchende Bio-Moleküle verbessert.

Wird im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Szenario eine elektrische Spannung 313 zwischen die Referenzelektrode 312 und die Permeationsschicht 303 angelegt, so dass die Permeationsschicht 303 elektrisch negativ geladen ist, so werden sich elektrisch positiv geladene Bio-Moleküle in der Umgebung der Permeationsschicht 303 infolge von Elektrophorese versammeln. So sind beispielsweise Proteine bei physiologischen pH-Werten oft elektrisch positiv geladen.

Der eigentliche Nachweis der in einer zu untersuchenden Flüssigkeit 314 möglicherweise enthaltenen Bio-Moleküle erfolgt durch eine Anbindung der Bio-Moleküle an die

Fängermoleküle 311, die an der Oberfläche einer Elektrode 306 immobilisiert sind. Die Elektrode 306 kann aus einem beliebigen elektrisch leitfähigen Material hergestellt sein, das dazu geeignet ist, die auf ein bestimmtes nachzuweisendes Bio-Molekül zugeschnittenen Fängermoleküle 311 an ihrer Oberfläche zu immobilisieren. Als sehr geeignete Bindung hat sich die Gold-Thiol-Bindung herausgestellt. Alternativ können beispielsweise Trichlorosilane (SiCl_3) an Endabschnitten von Fängermolekülen 311 beispielsweise auf Silizium-, Aluminium- oder Titanoberflächen binden. Das elektrisch leitfähige Material der Elektroden 306 ist so zu wählen, dass die für eine bestimmte Anwendung geeigneten Fängermoleküle 311 daran immobilisieren.

Die Fängermoleküle können Nukleinsäuren (DNA oder RNA), Peptide, Proteine oder niedermolekulare Verbindungen sein. Als niedermolekulare Verbindungen werden in der Biochemie solche chemischen Verbindungen bezeichnet, deren Molekülgröße kleiner oder ungefähr 1700 Dalton (=Molekulargewicht in Gramm pro Mol) beträgt.

Die Fängermoleküle 311 sind individuell auf ein speziell nachzuweisendes Bio-Molekül zugeschnitten zu wählen. Denn eine Hybridisierung (schematisch in Fig. 1B dargestellt) erfolgt nur, wenn die Fängermoleküle 311 und die in der zu untersuchenden Flüssigkeit 314 möglicherweise enthaltenen nachzuweisenden Bio-Moleküle gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zueinander passen. Ist dies der Fall, so binden die DNA-Halbstränge an die Fängermolekülen 311, und verändern in charakteristischer Weise einen biochemischen oder physikalischen Parameter, derart, dass ein zwischen der ersten elektrischen Kontaktierung 307 und der zweiten elektrischen Kontaktierung 308 unter Zuhilfenahme des Mittels zum Erfassen eines elektrischen Signals 309 ein elektrisches Signal abgenommen wird, das bei erfolgter Hybridisierung bzw. bei nicht erfolgter Hybridisierung verschiedene Werte aufweist. Beispielsweise kann die Kapazität zwischen den

Elektroden 306, die als Kondensator aufgefasst werden können, als eine für den genannten Zweck geeignete elektrische Größe verwendet werden. Es ist allerdings zu betonen, dass das Anbinden von zu untersuchenden Molekülen an den

5 Fängermolekülen 311 nicht notwendigerweise durch ein elektrisches Signal detektiert werden muss, vielmehr können auch optische oder sonstige Parameter zu diesem Zweck herangezogen werden. So kann sich beispielsweise die optische Durchlässigkeit der Fängermoleküle 311 ändern, wenn daran

10 Bio-Moleküle angebunden haben.

Eine weitere Alternative der erfindungsgemäßen Biochip-Anordnung besteht darin, eine Mehrzahl von elektrisch leitfähigen Permeationsschichten 303 zu verwenden, die

15 jeweils in einem vorgegebenen Abstand voneinander angeordnet sind, wobei an jeder der Permeationsschichten 303 jeweils eine elektrische Spannung 313 anlegbar ist. Mit anderen Worten kann durch Hintereinanderschaltung mehrerer Permeationsschichten 303 mit beispielsweise sukzessiv

20 ansteigenden Spannungsbeträgen 313 eine mehrstufige Konzentrationserhöhung der nachzuweisenden Bio-Molekülen erreicht werden. Auf diese Weise ist ein Konzentrationsgradient der Bio-Moleküle ausbildbar, wobei die Konzentration an einem Ort um so höher ist, je geringer der

25 Abstand von diesem Ort zu der aktiven Sensorfläche ist.

Die Funktionsweise der erfindungsgemäßen Biochip-Anordnung soll im weiteren anhand eines weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiels erläutert werden, das als

30 Querschnittsansicht in Fig. 4A und als Draufsicht in Fig. 4B dargestellt ist.

Fig. 4A zeigt eine Biochip-Anordnung 400 mit einem Substrat 401, sieben Sensoren 402, einem Permeationsnetz 403, einem

35 Abstandshalter 404, einer Begrenzungseinrichtung 405, einer Einfüllvorrichtung 406, einer ersten elektrischen Kontaktierung 407 und einer zweiten elektrischen

Kontaktierung 408, elektrisch leitfähigen Verbindungsmitteln 409 und einer Referenzelektrode 410. Einige der in **Fig. 4A** gezeigten Merkmale der Biochip-Anordnung 400 sind in **Fig. 4B** nicht gezeigt.

5

Mittels der Einfüllvorrichtung 406 ist eine zu untersuchende Flüssigkeit in den Hohlraum der durch das Permeationsnetz 403 und die Begrenzungseinrichtung 405 ausgebildet wird, einfüllbar. Zwischen das Permeationsnetz 403 und die

10

Referenzelektrode 410 ist eine elektrische Spannung anlegbar, aufgrund derer infolge Elektrophorese die in der möglicherweise zu untersuchenden Flüssigkeit enthaltene nachzuweisende Bio-Moleküle sich in einem Umgebungsbereich des Permeationsnetzes 403 akkumulieren. Durch den

15

Abstandshalter 404 wird ein durch dessen Dicke vorgegebbarer Abstand zwischen dem Permeationsnetz 403 und der aktiven Sensorebene, also der Oberfläche des Substrates 401, auf oder in der die Sensoren 402 angeordnet sind, eingestellt. Dieser Abstand beträgt vorzugsweise 1 bis 2 μm .

20

Um die in **Fig. 4A** und **Fig. 4B** gezeigte Biochip-Anordnung 400 als DNA-Sensor zu betreiben, ist jeder der Sensoren 402 als eine elektrisch leitfähige Elektrode mit daran

25

immobilisierten geeigneten Fängermolekülen zu wählen (nicht gezeigt in **Fig. 4A**, **Fig. 4B**). Die zu untersuchende Flüssigkeit inklusive der biologischen Makromoleküle

30

durchdringt die Maschen 411 des Permeationsnetzes 403 (siehe **Fig. 4B**). Auf diese Weise geraten die nachzuweisenden Bio-Moleküle, beispielsweise DNA-Halbstränge, in Wirkverbindung mit den Fängermolekülen auf der Oberfläche der Elektroden.

35

Sind die nachzuweisenden Bio-Moleküle und die auf der Oberfläche der Elektroden immobilisierten Fängermoleküle zueinander komplementär, so erfolgt Hybridisierung. Dadurch verändert sich der elektrische Parameter Kapazität zwischen denen als Elektroden vorgesehenen Sensoren 402. Die Kapazität oder ein beliebiger anderer Parameter kann zwischen der

ersten elektrischen Kontaktierung 407 und der zweiten elektrischen Kontaktierung 408, erfasst werden.

Die elektrische Kopplung zwischen der ersten elektrischen Kontaktierung 407 bzw. der zweiten elektrischen Kontaktierung 408 und den Sensoren 402 ist durch elektrische Verbindungsmittel 409 realisiert. Diese können, wie die Sensoren 402 oder die elektrischen Kontaktierungen 407, 408, auf dem Substrat 401 (beispielsweise ein Siliziumwafer) integriert sein, oder als separate elektrische Bauelemente vorgesehen sein.

Wie in **Fig. 4A** gezeigt, ist der Abstandshalter 404 direkt auf der Oberfläche des Substrats 401 befestigt. Der Abstandshalter 404 kann beispielsweise auf der Oberfläche des Substrats 401 festgeklebt sein, alternativ kann der Abstandshalter 404 auch mittels eines halbleitertechnologischen Verfahrens auf der Oberfläche des Substrats 401 abgesetzt sein. Gemäß dem in **Fig. 4A**, **Fig. 4B** gezeigten Ausführungsbeispiel der Biochip-Anordnung 400 ist der Abstandshalter 404 als Polyimidring realisiert. Vorzugsweise weist die Dicke dieses Polyimidrings 1 bis 2 μm auf.

Auf der Oberseite des Abstandshalters 404 ist das Permeationsnetz 403 befestigt, beispielsweise aufgeklebt. Wie insbesondere in **Fig. 4B** gezeigt, ist das Permeationsnetz gemäß dem bevorzugten Ausführungsbeispiel als ein Netz von zueinander parallel gespannten Drähten, die in zwei zueinander senkrechten Richtung angeordnet sind, ausgestaltet, wodurch Maschen 411 ausgebildet werden.

Die Begrenzungseinrichtung 405 ist gemäß dem in **Fig. 4A**, **Fig. 4B** gezeigten Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Biochip-Anordnung 400 als Plexiglasröhre ausgebildet, die beispielsweise auf die Oberfläche des Permeationsnetzes 403 aufgeklebt ist. Wie in **Fig. 4B** gezeigt, sind sowohl der

Abstandshalter 404 als auch die Begrenzungseinrichtung 405 gemäß dem beschriebenen Ausführungsbeispiel der Biochip-Anordnung 400 im wesentlichen hohlzylinderförmig vorgesehen.

- 5 Abschließend sei darauf hingewiesen, dass mittels der Einfüllvorrichtung 406 eine zu untersuchende Flüssigkeit, üblicherweise im Milliliter- bis Mikroliterbereich, in die Biochip-Anordnung 400 eingefüllt werden kann. Die Einfüllvorrichtung 406 kann beispielsweise eine Pipette oder
- 10 eine Kanüle sein.

In diesem Dokument sind folgende Veröffentlichungen zitiert:

- [1] WO 99/38612 A1
- 5 [2] Washizu, M, Suzuki, S, Kurosawa, O, Nishizaka, T,
Shinohara, T (1994) „Molecular Dielectrophoresis of
Biopolymers“, IEEE Transactions of Industrial
Applications, 30(4):835-843
- 10 [3] WO 99/53093 A1

Bezugszeichenliste

- 100 Biochip-Anordnung
- 101 Substrat
- 102 erste Elektrode
- 103 zweite Elektrode
- 104 erster elektrischer Kontakt
- 105 zweiter elektrischer Kontakt
- 106 Fängermoleküle
- 107 zu untersuchende elektrolytische Flüssigkeit
- 108 DNA-Halbstränge
- 200 Biochip-Anordnung
- 201 Substrat
- 202 erste Interdigitalelektrode
- 203 zweite Interdigitalelektrode
- 300 Biochip-Anordnung
- 301 Substrat
- 301a Oberfläche des Substrats
- 302 Sensor
- 303 Permeationsschicht
- 303a untere Oberfläche der Permeationsschicht
- 303b unterer Hohlraum
- 303c oberer Hohlraum
- 304 Abstandhalter
- 305 Begrenzungseinrichtung
- 306 Elektrode
- 307 erste elektrische Kontaktierung
- 308 zweite elektrische Kontaktierung
- 309 Mittel zum Erfassen eines elektrischen Signals
- 310 Biochip-Anordnung
- 311 Fängermoleküle
- 312 Referenzelektrode
- 313 elektrische Spannung
- 314 zu untersuchende elektrolytische Flüssigkeit
- 315 weiterer Abstandhalter

- 320 Biochip-Anordnung
- 400 Biochip-Anordnung
- 401 Substrat
- 402 Sensor
- 403 Permeationsnetz
- 404 Abstandhalter
- 405 Begrenzungseinrichtung
- 406 Einfüllvorrichtung
- 407 erste elektrische Kontaktierung
- 408 zweite elektrische Kontaktierung
- 409 elektrische Verbindungsmittel
- 410 Referenzelektrode
- 411 Maschen

Patentansprüche

1. Biochip-Anordnung zum Erfassen von Bio-Molekülen mit
 - einem Substrat;
 - 5 • mindestens einem auf oder in dem Substrat angeordneten Sensor;
 - einer elektrisch leitfähigen Permeationsschicht, die in einem vorgegebenen, von Null verschiedenen Abstand von der Oberfläche des Substrats angeordnet ist, und an die
 - 10 eine elektrische Spannung anlegbar ist.
2. Biochip-Anordnung nach Anspruch 1, die ferner einen Abstandshalter aufweist, der zwischen dem Substrat und der Permeationsschicht angeordnet ist, und dessen Dicke gleich
- 15 dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht von der Oberfläche des Substrats ist.
3. Biochip-Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, die ferner eine Begrenzungseinrichtung aufweist, wobei die
- 20 Begrenzungseinrichtung entlang eines geschlossenen Weges auf der Permeationsschicht derart angeordnet ist, dass durch die Begrenzungsvorrichtung und die Permeationsschicht ein Hohlraum ausgebildet ist.
- 25 4. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welcher der mindestens eine Sensor mindestens eine Elektrode aufweist, wobei jede der Elektroden mit elektrischen Kontaktierungen koppelbar ist.
- 30 5. Biochip-Anordnung nach Anspruch 4, die ferner eine Vielzahl von Fängermolekülen aufweist, die mit mindestens einer der Elektroden gekoppelt sind.
- 35 6. Biochip-Anordnung nach Anspruch 4 oder 5, die ferner mindestens eine elektrische Kontaktierung aufweist, wobei mindestens eine der Elektroden mit mindestens einer der elektrischen Kontaktierungen gekoppelt ist, so dass an den

elektrischen Kontaktierungen mindestens ein Signal abnehmbar ist.

5 7. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die ferner eine Referenzelektrode aufweist, derart, dass zwischen die Permeationsschicht und die Referenzelektrode eine elektrische Spannung anlegbar ist.

10 8. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei der die Permeationsschicht einen Kern aufweist, der aus einem elektrisch leitfähigen Material hergestellt ist.

15 9. Biochip-Anordnung nach Anspruch 8, bei der die Permeationsschicht ferner eine den Kern umgebende Hülle aufweist, die aus einem porösen Material hergestellt ist.

20 10. Biochip-Anordnung nach Anspruch 9, bei der das poröse Material der Permeationsschicht Poren einer vorbestimmten Größe aufweist, derart, dass Moleküle, deren Größe kleiner oder gleich der vorbestimmten Porengröße ist, durch das poröse Material hindurchdiffundieren können, wohingegen Moleküle, deren Größe die vorbestimmte Porengröße übersteigt, nicht durch das poröse Material hindurchdiffundieren können.

25 11. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, bei der das elektrisch leitfähige Material der Permeationsschicht ein Metall oder ein Halbleiter ist.

30 12. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, bei der das elektrisch leitfähige Material der Permeationsschicht Gold ist.

35 13. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, bei der die Permeationsschicht als ein Gitternetz ausgestaltet ist.

14. Biochip-Anordnung nach Anspruch 13, bei der benachbarte Drähte des Gitternetzes voneinander in einem Abstand von ungefähr 100 nm angeordnet sind.

- 5 15. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 2 bis 14, bei welcher der Abstandshalter entlang eines geschlossenen Weges auf dem Substrat derart angeordnet ist, dass durch den Abstandshalter und das Substrat ein Hohlraum ausgebildet ist.
- 10 16. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 3 bis 15, bei welcher der Abstandshalter und/oder die Begrenzungseinrichtung im Wesentlichen hohlzylinderförmig sind/ist.
- 15 17. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 3 bis 16, bei welcher der Abstandshalter und/oder die Begrenzungseinrichtung aus einem elektrisch nicht leitfähigen Material hergestellt sind/ist.
- 20 18. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 3 bis 17, bei welcher der Abstandshalter und/oder die Begrenzungseinrichtung aus einem oder einer Kombination der Materialien Glas, Plexiglas, Polyimid, Polycarbonat, Polyethylen, Polypropylen oder Polystyrol hergestellt
- 25 sind/ist.
19. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 2 bis 18 mit mindestens einem weiteren Abstandshalter, die zwischen dem Substrat und der Permeationsschicht angeordnet sind, und
- 30 deren Dicke gleich dem vorgegebenen Abstand der Permeationsschicht von der Oberfläche des Substrats ist.
20. Biochip-Anordnung nach einem der Ansprüche 4 bis 19, bei der die mindestens eine Elektrode aus Gold hergestellt ist.

2/4

FIG 2A

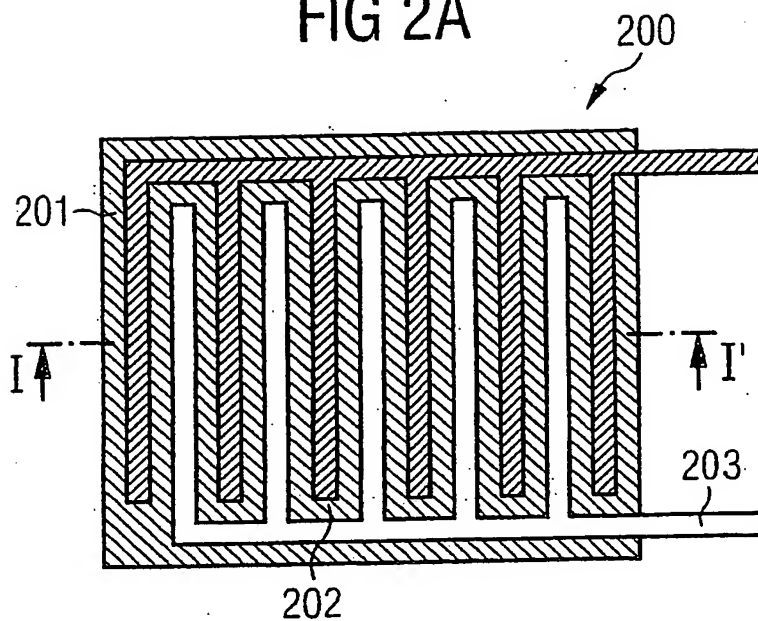
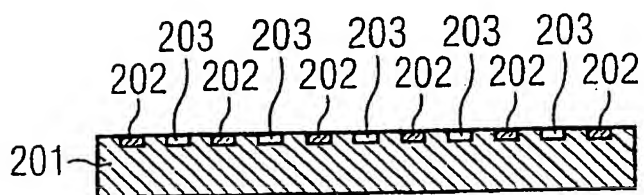


FIG 2B

Stand der Technik



3/4

FIG 3A

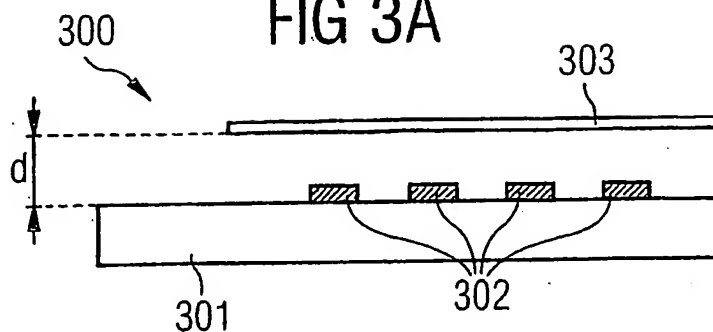


FIG 3B

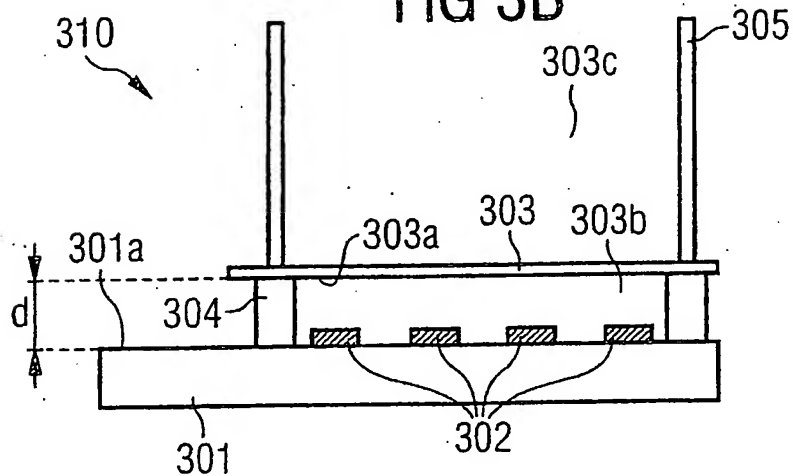
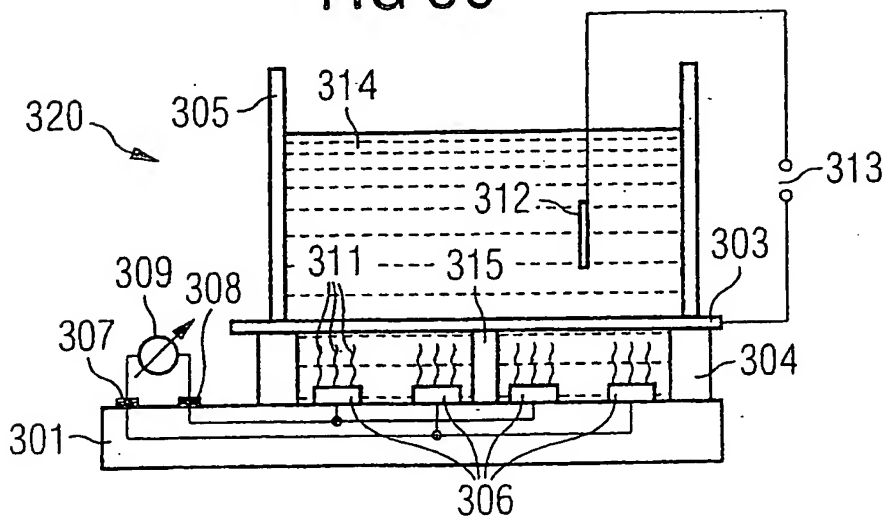


FIG 3C



4/4

FIG 4A

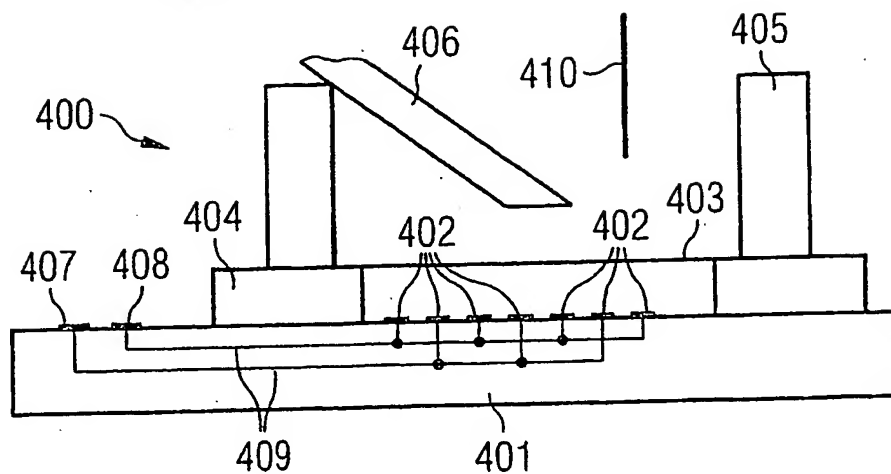


FIG 4B

